



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학석사 학위논문

**Nrf2 전사 활성화에 의한
NEMO유도와 세포 생존**

**Transcriptional activation of NEMO and cell
survival mediated by Nrf2**

2018년 2월

서울대학교 대학원
약학대학 약물학 전공
박 현 우

초록

Nrf2 전사 활성화에 의한 NEMO 유도과 세포 생존

Nrf2는 세포 생존의 중심적인 조절자로서, 활성 산소 제거를 통하여 세포사를 억제한다. NF- κ B essential modulator (NEMO)는 NF- κ B를 활성화 시킴으로써 세포 생존 단백질의 발현을 촉진한다. Nrf2와 NEMO 모두 세포 생존에 관여하지만, 두 단백질 사이의 관계에 대해서는 아직 연구된 바가 없다. 본 연구는 Nrf2의 새로운 타겟 유전자로 NEMO를 제시하였다. Nrf2가 NEMO의 전사에 대한 역할과 그 기능적 결과에 대해 조사하였다. GEO (Gene expression omnibus) 분석을 통하여 Nrf2 knockout 마우스에서 감소하는 유전자와 Keap1 knockout 마우스에서 증가하는 유전자의 교집합에서 IKBKG를 도출하였다. Nrf2를 활성화시켰을 때, TNF α 가 조절되는지 보기 위하여 sulforaphane을 사용하여 Nrf2를 활성화 시킨 결과, I κ B α 의 분해가 촉진되는 것을 관찰하였고 이를 통해 RelA가 증가하는 것을 관찰하였다. Nrf2가 knock out된 쥐의 간에서 NEMO가 크게 감소하였다. 반대로 Nrf2를 과발현 하였을 때에는, NEMO mRNA의 발현이 증가하였고, Nrf2 siRNA를 이용하여 knock down 시켰을 때에는 다시 감소하였다. CHIP sequencing과 크로마틴 면역침강법을 통해 Nrf2가 직접 NEMO를 전사적으로 활성화 한다는 것을 증명하였다. Nrf2에 의한 NEMO mRNA의 증가가 단백질 수준에서도 일어나는 것을 보였다. 세포 죽음을 수반하는 다양한 질환 모델에서 IKBKG의 발현을 관찰하였다. 아세트아미노펜 독성으로 내원한 환자들의 마이크로어레이에서는 NEMO와 Nrf2가 감소되어 있는 현상을 관찰하였고, 독성 용량의 아세트아미노펜을 투여한

쥐에서도 NEMO와 Nrf2가 낮은 발현을 보였다. 반대로, 알코올성 간염 환자의 간에서는 NEMO가 적응적으로 증가하였다. 세포 죽음 시에 염증이 필수적으로 수반되기 때문에, Nrf2를 통한 NEMO의 활성화가 마크로파지의 분화에 영향을 주는 지 탐구하였으나, M1, M2 마크로파지로의 분화에 영향을 주지 않았다. 본 연구에서는, Nrf2가 전사적으로 NEMO 유전자의 발현을 촉진한다는 것을 새롭게 규명하였다.

주요어: 세포사, Nrf2, NEMO, 아세타미노펜

학번: 2016-20819

이름: 박현우

목 차

List of Abbreviations.....	iv
List of Figures.....	v
I. 서론.....	1
II. 실험재료 및 방법.....	3
1. 시약 및 항체.....	3
2. 세포배양.....	3
3. 실험동물.....	3
4. 세포 분획의 분리.....	4
5. 면역 화학적 분석 (Immunoblotting).....	3
6. 실시간 역전사 중합 효소 연쇄 반응법 (Real-Time RT-PCR)	5
7. 형질도입 (Transfection).....	5
8. siRNA 트랜스펙션 (Transfection)	6
9. 크로마틴 면역침강법 (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP)	6
10. 생물정보학적 분석.....	7
11. 통계처리.....	7
III. 실험 결과.....	8
VI. 결론 및 고찰	21
V. 참고 문헌.....	25
ABSTRACT.....	29

List of Abbreviations

APAP	Acetaminophen
ARE	Anti-oxidant response element
BMDC	Bone marrow derived dendritic cell
BMDM	Bone marrow derived macrophage
ConA	Concanavalin A
LPS	Lipopolysaccharide
NEMO	NF- κ B essential modulator
NQO1	NADPH quinone dehydrogenase 1
Nrf2	nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2
OLT	Oltipraz
PRDX1	Peroxiredoxin 1
SFN	Sulforaphane
tBHQ	tert-Butylhydroquinone
TXNRD1	Thioredoxin reductase 1

List of Figures

- Figure 1.** Up-regulation of NF- κ B by Nrf2 activation
- Figure 2.** Transcriptional activation of NEMO by Nrf2
- Figure 3.** Up-regulation of NEMO protein by Nrf2
- Figure 4.** Altered NEMO level in various disease models
- Figure 5.** Role of NEMO in macrophage polarization

I. 서론

NF- κ B essential modulator (NEMO) 혹은 IKK γ (Inhibitor of κ B kinase (IKK) gamma)는 세포의 생존에 필수적인 분자이다. NEMO는 TNF α 신호에 의해서 활성화 되는 단백질로 NF- κ B를 활성화 함으로써 anti-apoptosis 단백질의 발현을 유도하여 세포사를 억제한다. NEMO가 간조직 특이적으로 knockout 된 경우 간세포의 사멸이 증가하여 자발적인 steatohepatitis를 통해 간세포암이 발생하는 것이 보고되어 있다(Kondylis, Polykratis et al. 2015). 간조직뿐만 아니라 장조직에서 NEMO가 knockout이 된 경우에도 장의 상피세포가 자발적인 apoptosis를 일으켜 염증성 장질환이 유발된다는 것이 알려져 있다(Vlantis, Wullaert et al. 2016). NEMO의 세포보호 기능은 IKK α , IKK β 와 고분자량 복합체(IKK complex) 형성을 통한 NF- κ B 활성화와 NEMO의 단독적인 RIPK1 활성 억제 기전으로 설명된다. 하지만, 다양한 질환에서 NEMO의 발현을 조절하는 세포 내 메커니즘에 대해서는 아직까지 연구된 바가 없다.

전사인자 Nrf2의 기능은 산화적 스트레스(oxidative stress)를 포함한 스트레스 자극으로부터 세포를 보호하는 것으로, 여러 항산화 효소의 유전자 발현을 증가시킴으로써 항산화 반응(antioxidant response)을 활성화 시킨다(Wakabayashi, Dinkova-Kostova et al. 2004, Kaspar, Niture et al. 2009). 뿐만 아니라, 최근 Nrf2가 직접적으로 세포의 생존 혹은 사멸 인자를 조절할 수 있는 가능성도 보고되었다. 예를 들면, 세포 생존인자인 Bcl-2, miR-125b를 up-regulation하거나(Cory and Adams 2002, Niture and Jaiswal 2012), 세포 사멸인자인 miR-29b를 down-regulation함으로써 세포의 생존을 돕는 기능이 보고되어 있다(Shah, Zaitseva et al. 2015). 하지만, 세포의 생존에 필수적인 NEMO 유전자

를 조절하는지에 대해서는 알려진 바가 없다. 본 연구에서는 NEMO가 Nrf2에 의해 전사적으로 조절되는지 여부를 규명하고자 하였으며, 기능적으로는 Nrf2의존적 NEMO발현이 세포 죽음의 억제에 기여하는지를 밝히하고자 하였다.

아세트아미노펜은 가장 많이 복용되는 약물 중 하나로, 과다 복용 시간 독성을 일으키며 심각한 경우에는 급성 간 부전까지 유발한다 (Davidson and Eastham 1966, Black 1984). 본 연구는, 간세포 죽음을 동반하는 질환 모델에서 NEMO의 발현이 어떻게 변하는지 알아보고자 하였다. GEO 데이터베이스 분석을 통하여 심각한 간 손상 질환인 아세트아미노펜 독성 모델에서는 NEMO가 크게 감소하는 한편, 약한 간 손상 질환 모델인 알코올성 간염 환자에서는 NEMO가 증가하는지 여부를 관찰하였다.

본 연구에서는 처음으로 Nrf2가 NEMO의 전사적 조절자임을 제시하고자 하였는데 간세포에서는 Nrf2가 세포 죽음의 조절자로서 간세포 죽음을 동반하는 질환 모델에서의 역할을 연구하고, 보호 효과 여부를 찾고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 시약 및 항체

β -actin 항체는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 구입하였다. P-MLKL 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA)에서 구입하였다. NEMO, Nrf2 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)에서 구입하였다. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit, goat anti-Mouse IgG 는 Zymed Laboratories (San Francisco, CA)에서 구입하였다.

2. 세포배양

AML-12, HepG2, HT-29는 모두 American Type Culture Collection (Rockville, MD)에서 구입하였다. Primary Mouse hepatocyte의 분리는 기존에 사용하던 방법으로 진행하였다 (Kay HY, J Nutr 140, 2010). 모든 세포는 37°C 및 5% CO₂ 조건하에 약 80%-90%의 confluency 를 갖도록 배양하였다. AML-12 세포는 DMEM/F-12 medium (GIBCO-BRL)에서 10% fetal bovine serum (FBS), 50 units/ml penicillin 및 50 μ g/ml streptomycin, insulin-transferrin-selenium X (ITSX) (GIBCO-BRL), dexamethasone (40 ng/ml; Sigma) 이 함유된 DMEM/F-12 medium (GIBCO-BRL) 배양하였고, HepG2 세포와 HT-29는 10% fetal bovine serum (FBS), 50 units/ml penicillin 및 50 μ g/ml streptomycin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양하였다.

3. 실험동물 (Animal treatment)

동물 실험은 ‘실험동물 관리 및 이용에 관한 지침’에 따라 시행되었다. 실험동물로 사용된 웅성 C57/BL6 mice 를 Charles River Orient (Seoul, Korea)에서 공급받아 55 \pm 5% 의 습도, 22 \pm 2 C 의 온도 및 환기

가 조절된 서울대학교 약대 동물실험 연구동에서 1 주 이상 사육하여 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 6 주 된 C57BL/6 마우스에 아세타미노펜을 정맥으로 주입한 후 6 시간 후에 CO₂ 로 질식사시켰다.

4. 세포 분획의 분리

배양 세포의 배지를 제거한 후 PBS 로 세척하고 세포를 긁어 모아 3000 g 에서 3 분간 원심분리 하였다. 상등액을 제거한 후 단백질 분해효소 억제제를 첨가한 용해 완충액 [10 mM Tris (pH 7.1), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5% Triton X-100, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride] 을 가하여 1 시간 동안 얼음 위에서 완전히 용해한 후 10,000 g 에서 10 분간 원심분리하여 얻은 상등액을 전세포 추출액으로 사용하였다. 단백질 농도는 Bradford 정량법 (Bio-Rad® protein assay kit, Bio-Rad, Hercules, CA) 을 이용하여 정량 하였다.

5. 면역 화학적 분석 (Immunoblotting)

획득한 세포 분획의 단백질을 Mighty Small II SE 250 장치 (Hoefer, Inc, San Francisco, CA) 를 이용하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis 방법으로 분리하였다. 시료를 시료희석완충액 [63mM Tris (pH 6.8), 10% glycerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 0.0013% bromophenolblue]에 희석하여 7.5%, 9%, 15%의 겔을 사용하여 전기 완충액 (0.12M Tris, 0.96M glycine, 0.5% SDS) 내에서 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 겔은 전기영동 전달장치를 이용하여 전이 완충액 (25mM Tris, 192mM glycine, 20% v/v methanol, pH 8.3) 내에서 190mA 로 1시간 10분동안 nitrocellulose지에 단백질을 전이시켰다. 관찰하려는 단백질에 대한 1차 항체와 반응시

킨 후 이어서 Horseradish peroxidase (HRP) 와 결합되어 있는 2차 항체와 1시간 반응시키고 ECL chemiluminescence 시스템 (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) 을 이용하여 발색 하였다.

6. 실시간 역전사 중합 효소 연쇄 반응법 (Real-Time RT-PCR)

총 RNA 는 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 제조사의 권장방법에 따라 추출하였다. 1 µg 의 RNA 와 AMV 역전사 효소 (Promega, Madison, WI), 프라이머로서 oligo(dT)16을 사용하여 cDNA 를 합성하였다. LightCycler 2.0 System (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)과 SYBR Premix Ex Taq (Takara, Shiga, Japan)를 이용하여 제조사의 지시된 방법에 따라 수행하였고 결과값은 18s rRNA와 β -actin 의 상대적인 값으로 보정하였다. 증폭된 산물의 특이성은 melting curve 분석을 통하여 확인하였다. DNA 증폭에 사용된 primer 는 다음과 같다.

Mouse β -actin, 5'-CTGAGAGGGAAATCGTGCGT-3' (sense) 5'-TGTTGGCATAGAGGTCTTTACGG-3' (antisense); 18s rRNA, 5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3' (sense) 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3' (antisense); mouse IKBKG, 5'-GAGGCCCTGGTAGCCAAAC-3' (sense) 5'-ATGGCAGCCAACTTTCAGCTT-3' (antisense); human IKBKG, 5'-TCATCGAGG TCCCATCAGGT-3' (sense) 5'-GAGACTCTTCGCCCAGTACG-3' (antisense); human β -actin, 5'-CTGAGAGGGAAATCGTGCGT-3' (sense) 5'-TGTTGGCATAGAGGTCTTTACGG-3' (antisense).

7. 형질도입 (Transfection)

형질도입은 6-well plate 의 세포 배양 용기에서 약 50-70% 배양된 세포를 혈청 및 항생제가 없는 Opti-MEM® (Life Technologies, Grand

Island, NY)에서 약 6 시간 정도 안정화 시킨 후, Fugene HD (Roche, Indianapolis, IN)를 사용하여 플라스미드를 세포 내 형질도입하였다. 플라스미드 1 µg 당 3 µl 의 Fugene HD 와 혈청과 항생제가 없는 1 ml 의 Opti-MEM®과 반응시켜서 세포에 넣어주고 약 6 시간 반응시켰다. 이때 대조군 세포에는 형질도입되는 플라스미드의 총량을 보정하기 위하여 과발현 플라스미드의 backbone 만을 가지는 플라스미드 (mock) 를 형질도입하였다. 형질도입 후 1% 혈청이 포함된 항생제가 없는 Eagle's minimum essential medium 에 12 시간 정도 안정화시킨 후 약물을 처리하였다.

8. siRNA 트랜스펙션

siRNA 트랜스펙션을 위해서 6-well plate 에서 24 시간 배양된 HepG2 세포주 (2×10^5 cells/well)를 Lipofectamine 2000 Life Technologies, Grand Island, NY) 을 이용하여 트랜스펙션하였다. 세포에 상응하는 siRNA (200 pmol)를 도입하고 혈청을 포함한 medium 으로 24 시간 동안 배양한 뒤 실험에 사용하였다. Nrf2 siRNA, non targeting control siRNA 는 Dharmacon (Chicago, IL)에서 구입하였다.

9. 크로마틴 면역침강법 (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP)

Sulforaphane 을 24 시간 처리한 세포에 1% formaldehyde 를 첨가하여 크로마틴과 가교결합을 형성하였다. 크로마틴 면역침강법은 제작자의 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) 권장방법에 따라 수행하였다.

IKBKG 의 ARE1 영역에 대한 primer (5'-ATCGGGACAGACTCCAGAAA-3' (sense) 5'-CCTTACCCACCCCTACTGT-3' (antisense)), ARE2 영역에 대한 primer

(5'-GGGGGCTGCTGAGTTAGTTC-3' (sense) 5'-
ACATTCTGGGCTGACTTCC-3' (antisense)를 이용하여 중합 효소
연쇄 반응을 수행하였다.

10. 생물정보학적 분석

GEO 데이터세트(GSE11287, GSE8969,)에서 유의적으로 변화하는 (2
초과 또는 0.5 미만, $P < .01$) 유전자군을 도출하고 사용하여
분석하였다. TNF α 신호 전달 관련 유전자를 대상으로 STRING 9
데이터베이스를 사용하여 유전자 상관관계 네트워크를
도출하였으며, Cytoscape 3 프로그램(미국 국립생물 공학정보센터)를
이용하여 시각화하였다. 연구에 이용한 다른 GEO
데이터세트(GSE74000)의 히트맵 시각화는 R 프로그램으로
수행하였다.

11. 통계처리

면역화학적 분석으로 시각화한 단백질 띠를 Photoshop CC 프로그램
(Adobe Systems)으로 정량하였다. 데이터는 평균 \pm 표준오차로 표기
하였으며 통계적 유의성은 student's t-test 를 이용하여 $P < 0.05$ 또는
 $P < 0.01$ 을 기준으로 하였다. Pearson 상관분석 방법에 따라 상관계수
 r 을 구하고 통계적 유의성을 계산하였다.

III. 실험 결과

1. Nrf2에 의한 NF- κ B의 활성화

Nrf2 knockout시 발현이 감소하는 gene과 Keap1 knockout시 발현이 증가하는 유전자의 연관성을 분석하기 위해 GEO 데이터세트 분석을 통해 Nrf2 knockout 마우스의 마이크로어레이 데이터(GSE8969)와 Keap1 knockout 마우스의 마이크로어레이 데이터(GSE11287) 두 군 사이의 교집합 중 84개의 유전자를 추려내었다. 그 84개의 유전자 중 단백질 수준에서 상호작용하는 유전자를 String 프로그램을 이용하여 분석하였고 TNF α signaling pathway 하위에 속하는 MAP4K4와 IKBKG를 도출하였다 (Fig 1A). 실제로, Nrf2의 활성화가 TNF α signaling pathway에 영향을 주는지 알아보기 위하여, Nrf2 활성화제인 sulforaphane을 처리한 후 TNF α 하위에 있는 단백질을 조사하였다. 자극으로 활성화 되는 것으로 잘 알려진 NF- κ B의 지표 단백질을 관찰하였다. RelA가 증가하고, I κ B α 가 감소하는 것을 관찰하였다 (Fig 1B). 이를 통해 Nrf2가 TNF α 하위의 신호를 조절하는 기전을 추측하였다 (Fig 1C).

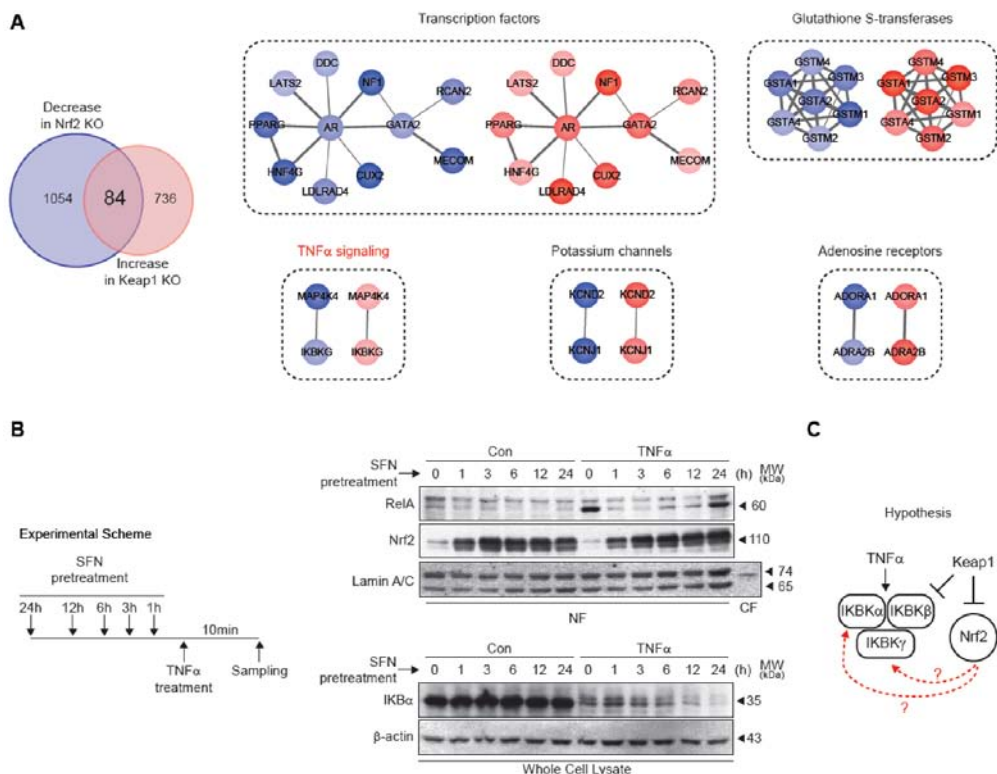


Figure 1. Up-regulation of NF- κ B by Nrf2 activation

(A) Gene venn diagrams of upregulated genes and downregulated genes in liver samples from Keap1 knockout and Nrf2 knockout mouse model (GSE11287 and GSE8969 respectively). The protein-protein interaction network of genes that are decreased in Nrf2 knockout mice and increased in Keap1 knockout mice, generated using String database.

(B) Effects of sulforaphane on protein levels of RelA and I κ B α . Immunoblots were performed on the lysates of HepG2 cells that had been treated with different time point of sulforaphane.

(C) Schematic diagram of proposed hypothesis

2. Nrf2에 의한 NEMO의 전사적 활성화

Nrf2에 의한 NF- κ B 신호의 활성화는 Nrf2에 의한 직접적 활성화일 수도 있고, NF- κ B 상위에 존재하는 단백질이 Nrf2에 의해 전사적으로 활성화 된 결과일 수 있다. NF- κ B essential modulator (NEMO)는 IKK α , IKK β 와 함께 IKK protein complex를 형성하여 (Yamaoka et al. 1998; Rothwarf et al. 1998; Mercurio et al. 1999), NF- κ B를 억제하는 I κ B α 의 분해를 유도함으로써 NF- κ B의 활성화를 촉진한다. Nrf2가 IKK complex를 이루는 단백질 중 하나를 mRNA 수준에서 활성화 시키는 지 조사하기 위하여 Real time PCR을 수행하였다. Sulforaphane을 경시적으로 처리하였을 때, NEMO의 유전자인 *IKBKG*의 전사가 증가하는 현상을 관찰하였다 (Fig 2A). 다른 세포주인 AML12에서도 동일한 현상을 관찰하였다 (Fig 2B). 다른 Nrf2 활성화제인 tert-Butylhydroquinone(tBHQ)와 Oltipraz(Olt) 또한 mRNA 수준에서 *IKBKG*의 발현을 증가시켰다 (Fig 2C). HEK293A 세포에서 Nrf2를 과발현 시켰을 때도 *IKBKG*가 증가하였다 (Fig 2D). GEO database 분석을 통하여, Nrf2 knockout시 감소하며 keap1 knockout시 증가하는 것을 관찰하였다 (Fig 2E). Nrf2에 의한 *IKBKG*의 증가가 Nrf2가 직접적인 전사적 활성화에 의한 것인지 알아보기 위하여 CHIP sequencing 분석을 하였다. *IKBKG*의 upstream에 Nrf2가 결합할 수 있는 antioxidant response element(ARE)가 두 곳이 있으며 이 서열이 종 간에서 보존되어 있었다 (Fig 2F). 크로마틴 면역침강분석법을 통해 실제로 두 ARE 모두에 Nrf2가 결합하는 것을 관찰하였다 (Fig 2G). 또한, 아세틸화와 중합효소의 결합이 일어나는 것을 통해 전사적 활성화임을 보였다.

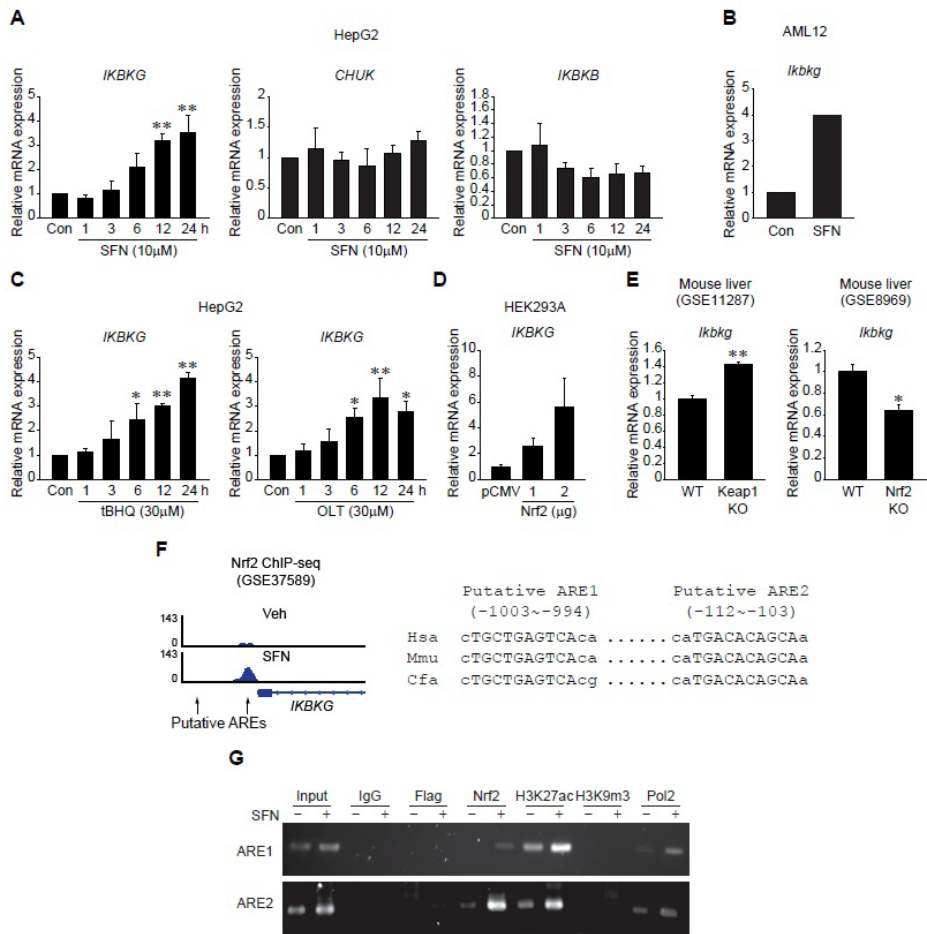


Figure 2. Transcriptional activation of NEMO by Nrf2

(A) Effects of sulforaphane (10 μM) on mRNA level of *IKBKG*, *CHUK* and *IKBKB*. Real time PCR was performed on mRNA obtained from HepG2 treated with sulforaphane for indicated time periods (n=3).

(B) Effects of sulforaphane (10 μM) on mRNA level of *IKBKG*. Real time PCR was performed on mRNA obtained from AML12 treated with sulforaphane for 24 hours.

(C) Effects of tBHQ and OLT on mRNA of *IKBKG*. Real time PCR was performed on mRNA obtained from HepG2 treated with tBHQ and OLT for indicated time periods (n=3).

(D) Real time PCR assays for HEK293A cells transfected with Mock or Nrf2

over expression vector.

(E) IKBKG transcript levels in liver samples from Keap1 knockout or Nrf2 knockout mouse model using cDNA array database (GSE11287 and GSE8969 respectively).

(F) CHIP-seq analysis for anti-oxidant response element region in IKBKG in lymphoblastoid cells treated with sulforaphane using cDNA array database (GSE37589)

(G) CHIP assays for Nrf2 binding to the promoter regions of IKBKG. HepG2 cells were treated with sulforaphane for 24 hours. DNA-protein complexes precipitated with Nrf2 were subjected to PCR amplifications using the primers flanking the indicated anti-oxidant response elements (AREs). IgG immunoprecipitation represents negative control. The specificity of Nrf2 binding was verified using the primers targeting an irrelevant region in the promoter. One tenth of cross-linked lysates served as the input control.

For A and C, data represented the mean \pm SEM (n=3 each, *p<0.05, **p<0.01)

3. Nrf2에 의한 NEMO 단백질의 발현 증가

다음으로, Nrf2에 의한 NEMO의 전사적 활성화가 단백질의 증가로 이어지는지 보기 위하여 Immunoblot분석을 통해 NEMO를 관찰하였다. 서로 다른 Nrf2 활성화제인 sulforaphane, tBHQ, OLT 각각의 자극은 모두 NEMO 단백질을 증가시켰다 (Fig 3A). Nrf2 knockout 쥐로부터 분리한 간에서는 반대로 NEMO의 발현이 감소하였다 (Fig 3B). siRNA 트랜스펙션을 통해 HepG2 세포에서 Nrf2의 발현을 억제하였을 때, NEMO 또한 발현이 감소 되는 것을 관찰하였다 (Fig 3C).

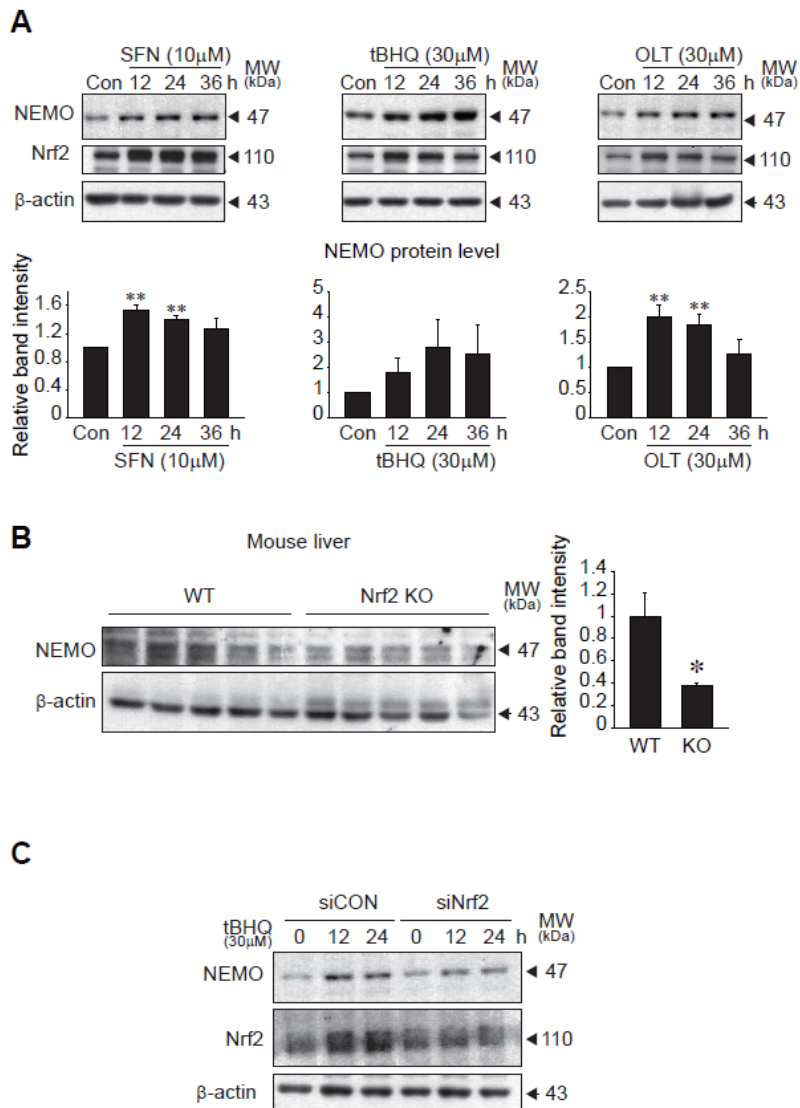


Figure 3. Up-regulation of NEMO protein by Nrf2

(A) Immunoblottings for NEMO and Nrf2 in HepG2 cells treated with SFN, tBHQ and OLT for indicated time periods. Data represent the mean \pm SEM, from 3 separate experiments (significantly different as compared to control, ** $p < 0.01$)

(B) Immunoblotting for NEMO in the livers from the wild type and Nrf2

knockout mice.

(C) Immunoblotting for NEMO and Nrf2 in HepG2 cells treated with tBHQ for indicated time periods after transfection with siNrf2 (or Mock).

4. 다양한 질환 모델에서 NEMO의 발현 변화

다양한 질환 모델에서 IKBKG의 발현 변화를 관찰하고자 아세트아미노펜으로 인해 유발된 급성 간부전 환자의 간조직 트랜스크립토미 데이터(GSE74000)를 분석하였다. 아세트아미노펜으로 인해 유발된 급성 간부전 환자에서 IKBKG와 Nrf2의 타겟 유전자들이 감소하는 경향을 보였다 (Fig 4A). 실제로 아세트아미노펜을 치사량으로 주입한 마우스에서도 동일하게 Nrf2와 NEMO의 발현이 감소하는 것을 관찰하였다 (Fig 4B). 마우스에서 분리한 간세포에서도 동일하게 Nrf2와 NEMO의 발현이 감소하여 있는 것을 확인하였다 (Fig 4C). Lipopolysaccharide(LPS)와 D-GalN을 처리한 마우스의 간조직으로부터 얻은 RNA 데이터(GSE66745)에서도 유사하게 IKBKG의 발현이 감소하였다 (Fig 4D). 심각한 간 손상을 입은 상황에서 IKBKG의 발현이 낮아지는 것으로 생각된다. 반면, ConA를 처리한 마우스로부터 얻은 간조직 데이터(GSE17184)와 알코올성 간염 환자의 간 조직 cDNA 마이크로어레이 데이터(GSE28619)에서는 IKBKG의 발현이 증가하였다 (Fig 4E). 또한, 알코올성 간염 환자에서는 Nrf2 타겟 유전자인 TXNRD1, NQO1, PRDX1과 IKBKG는 상관관계를 보였다 (Fig 4F).

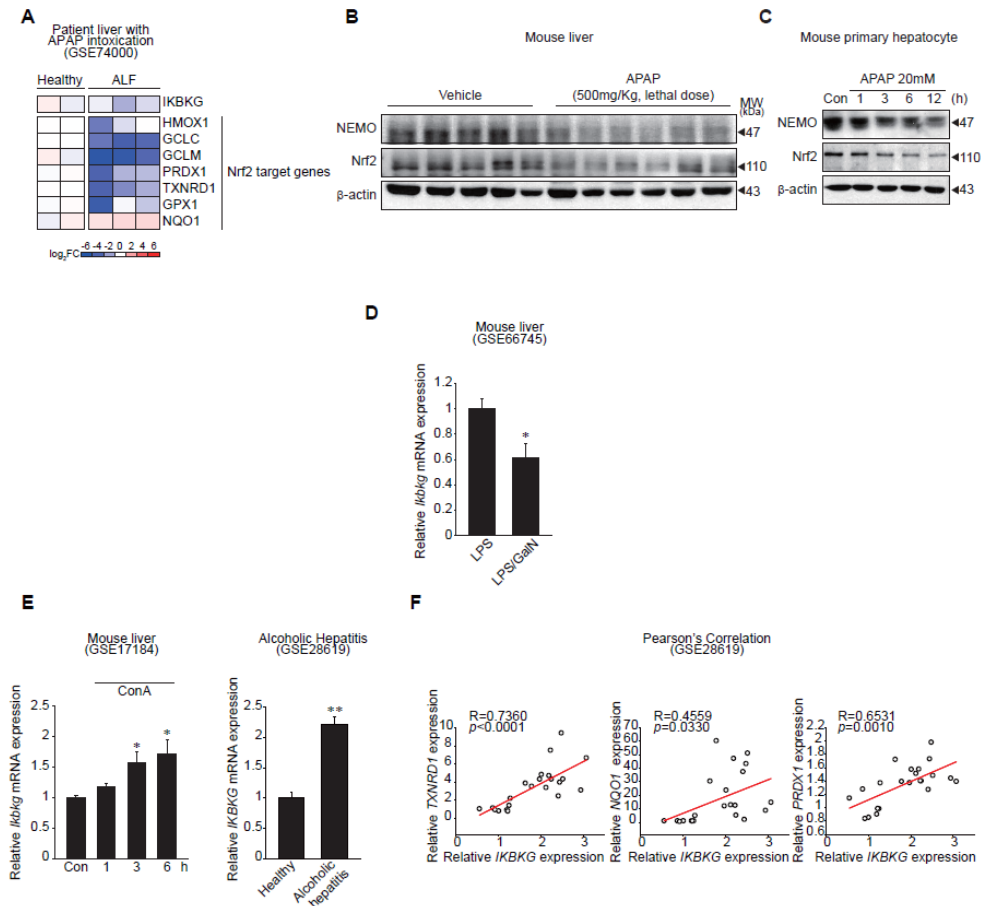


Figure 4. Altered NEMO level in various disease models

(A) Heatmap of the significantly down-regulated IKBKG and Nrf2 target genes in acetaminophen intoxicated patients (GSE74000)

(B) Immunoblotting for NEMO and Nrf2 in wild type and Nrf2 knockout mice. Mice were injected with APAP(500mg/kg) intravenously 6 hours before sacrifice.

(C) Immunoblotting for NEMO and Nrf2 in the liver lysates of mouse primary hepatocytes treated with APAP(20mM) in indicated time periods.

(D) IKBKG transcript level in liver samples from LPS/GalN mouse model using cDNA array database (GSE66745).

(E) IKBKG transcript level in liver samples from ConA-treated mouse model

and patients with alcoholic hepatitis using cDNA array database (GSE17184 and GSE28619 respectively).

(F) Correlations between IKBKG and TXNRD1, NQO1 and PRDX1 were analyzed.

5. 마크로파지 분화 시 NEMO의 역할

간세포 죽음을 동반하는 다양한 질환 모델에서, 질환이 악화되면서 염증이 유발되고, 이로 인해 간 조직의 손상이 악화된다. NEMO가 간세포뿐만 아니라, 염증을 매개하는 마크로파지의 분화에 영향을 미치는지 보기 위해 알코올성 간염 환자의 cDNA 어레이 데이터(GSE28619)를 이용하였다. IKBKG의 발현이 낮은 군과 높은 군으로 나눠 두 군 사이에 M2 마크로파지와 M1 마크로파지의 발현을 비교하였다. IKBKG의 발현이 높은 군에서 M2 마크로파지의 지표인 Arg1과 Mrc1의 발현이 높았다 (Fig 5A). 실제로 단백질 수준에서 차이가 나는지 보기 위해 bone marrow derived dendritic cell(BMDC), bone marrow derived macrophage(BMDM), M1, M2 마크로파지에서 NEMO, Nrf2의 발현을 비교하였으나 경향성을 보이지 않았다 (Fig 5B). NEMO는 receptor interacting kinase 1(RIPK1)의 kinase activity를 억제하는 것으로 알려져 있다. RIPK inhibitor인 GSK872를 처리하여도, M1마크로파지나 M2 마크로파지로의 분화에는 영향이 없었다 (Fig 5C).

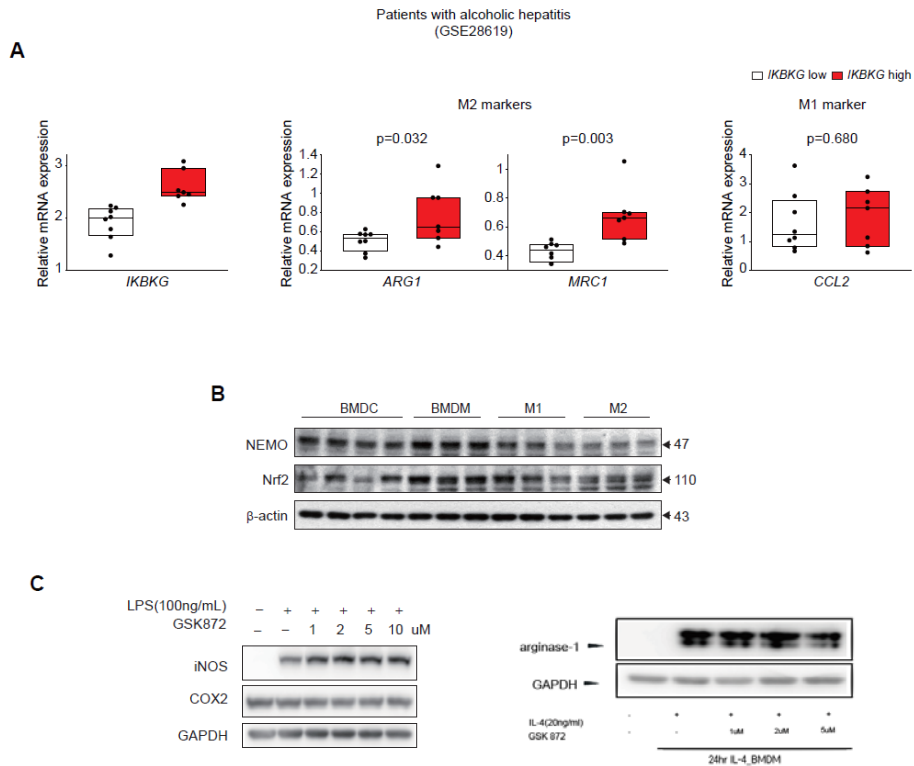


Figure 5. Role of NEMO in macrophage polarization

(A) Patients with alcoholic hepatitis were categorized into 2 groups by IKBKG expression level. ARG1, MRC1 and CCL2 transcript levels in alcoholic hepatitis patients using cDNA array database (GSE28619).

(B) Immunoblottings for NEMO and Nrf2 in the lysates of BMDC, BMDM, M1 macrophage and M2 macrophage.

(C) Immunoblotting for iNOS and COX2 in the lysates of M1 macrophage treated with LPS (100ng/mL) and GSK872(left) and immunoblotting for arginase-1 in the lysates of M2 macrophage treated with IL-4 and GSK872(right).

IV. 결론 및 고찰

NF- κ B essential modulator (NEMO)는 NF- κ B의 전사를 촉진하는 단백질로, 병원균의 침입이나 염증 반응으로 활성화되는 TNF α 자극으로부터 유도되는 세포 죽음 신호를 억제하는데 필수적인 단백질이다(Chen and Goeddel 2002). 이러한 세포 생존에 관여하는 신호 기전은 연구가 잘 되어있지만, NEMO의 전사적 조절에 대한 이해는 상대적으로 부족하다. 본 연구 결과는 NEMO가 Nrf2에 의해 전사적으로 조절됨을 처음으로 규명하였다.

Nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2 (Nrf2)는 세포 내 redox 균형을 인식하고 항산화 단백질의 전사를 조절하는 핵심 단백질이다. 활성 산소의 증가로 인해 세포 내 소기관에 손상이 가해지는 경우, Nrf2는 활성 산소 제거 단백질의 전사를 촉진하여 항산화 스트레스를 감소시킴으로써 세포의 생존에 기여한다. Nrf2는 일반적인 상황에서 E3 유비퀴틴 연결효소의 adaptor 단백질인 Keap1에 의하여 폴리 유비퀴틴화 된 후, 26s 프로테아좀 단백질에 의해 분해된다. 하지만, 활성 산소 스트레스 자극에 의해서 Keap1의 시스테인 기에 변화가 생기게 되면 keap1에 구조적 변화가 생기게 된다. 이로 인해, keap1은 E3 유비퀴틴 연결효소 adaptor 단백질로서의 기능을 상실하게 되고, Nrf2는 안정화되어 핵 내로 이동하여 목표 단백질들의 전사를 촉진하게 된다. NEMO는 TNF α 에 의해 활성화 되는 단백질로, NF- κ B를 활성화하는데 필수적이다(Yamaoka, Courtois et al. 1998). TNF α 자극에 의해 세포막에 TRAF2, TRADD, RIPK1으로 구성된 단백질 복합체가 형성 되고(Hsu, Huang et al. 1996), 이 복합체에 의해 IKK α , IKK β 와 NEMO로 구성된 IKK 복합체가 활성화된다(Rothwarf, Zandi et al. 1998, Devin, Cook et al. 2000). 활성화된 IKK 복합체는 NF- κ B를 억제하는 I κ B를 인산화

시킴으로써 유비퀴틴 의존성 프로테아좀 기전을 활성화하여 I κ B를 분해한다(Krappmann and Scheidereit 2005). 이로 인해 NF- κ B가 활성화되어 핵 내로 이동한 후, 타겟 유전자들의 전사를 촉진한다. Nrf2와 NF- κ B의 관계를 규명한 연구는 이미 많이 보고된 바 있다. Keap1에 의하여 IKK 복합체 구성 단백질인 IKK β 가 유비퀴틴 화 된 후 프로테아좀에 의해 분해되며, 이로 인해 NF- κ B의 신호가 약화된다는 것이 알려져 있다(Lee, Kuo et al. 2009). 이외에도 Nrf2 타겟 유전자인 HO-1에 의하여 NF- κ B의 활성화가 억제된다는 연구 결과가 보고된 바 있다(Bellezza, Tucci et al. 2012). 본 연구는 Nrf2가 NEMO의 전사적 활성화를 통하여 NF- κ B의 활성화에 기여한 다는 것을 처음으로 밝혔다. 이러한 연구 결과는, Nrf2가 가장 잘 알려진 기능인 활성 산소 제거를 통하여 세포를 죽음으로부터 보호하는 기능 이외에도, NF- κ B의 활성화를 통하여 적극적으로 세포 생존에 기여할 가능성을 보여준다.

NF- κ B가 세포 생존에 어떻게 기여하는지에 대해 이미 많은 보고가 있다. TNF α 에 의해 활성화 된 NF- κ B는 다양한 anti-apoptosis 단백질의 전사를 촉진한다. 특히, cFLIP(Micheau, Lens et al. 2001), cIAP와 XIAP의 발현을 통해 caspase-8의 활성을 저해하고(Stehlik, de Martin et al. 1998, Stehlik, de Martin et al. 1998), death receptor를 안정화 시킴으로써 apoptosis의 활성을 저해함과 동시에 지속적으로 NF- κ B를 활성화한다. Nrf2에 의한 세포 죽음의 억제는, NF- κ B 이외에도 NEMO의 RIPK1 kinase 활성 억제를 통한 작용도 기여 할 것이라고 추측된다. NEMO가 간세포 특이적으로 knockout 되어있는 마우스에서 간세포의 비정상적인 apoptosis로 인해 1년 이내에 간암으로 진행된다고 보고되어 있다. NEMO가 RIPK1의 kinase 활성을 억제함으로써 RIPK1에 의한 caspase의 활성 또는 RIPK1, RIPK3로 이루어진 necrosome의 생성을 억제함으로써 세포 죽음을

억제한다. Nrf2에 의한 NEMO의 활성화는 크게 두 가지 신호 기전을 통해 세포 생존 신호를 활성화시킬 것이라고 사료된다. 1) NEMO의 활성화를 통한 NF- κ B의 anti-apoptosis 단백질 생성 촉진, 2) NEMO의 RIPK1 kinase 활성 억제를 통한 세포 죽음 신호의 억제이다.

아세트아미노펜의 섭취는 심각한 간 손상을 유발한다고 알려져 있다. 아세트아미노펜은 CYP 효소에 의해 NAPQI(N-Acetylbenzoquinoneimine)으로 대사되어 세포 내 소기관을 구성하는 단백질을 파괴함으로써 독성을 나타낸다. 아세트아미노펜 독성으로 인해 내원한 환자의 GEO 데이터 분석에서 NEMO 유전자가 크게 감소해있음을 관찰하였다. 또한, 심각한 간 손상을 동반하는 면역 질환 모델인 LPS/GalN 처리 마우스의 데이터베이스에서도 마찬가지로 NEMO의 발현량이 크게 감소해있었다. 본 연구에서는, 아세트아미노펜을 치명적인 용량으로 주입한 마우스를 이용하여 실제로도 아세트아미노펜 독성을 일으킨 마우스에서 NEMO와 Nrf2의 발현이 크게 감소되어있음을 관찰하였다. 이와 반대로, 약한 간손상을 동반하는 알코올성 간염 환자나 약한 면역 질환 모델인 ConA 처리 마우스의 데이터베이스에서는 NEMO의 발현이 증가해있는 경향을 보였다. 또한, Nrf2의 타겟 유전자와도 양의 상관관계를 보였다. 이는 NEMO가 세포사멸을 동반하는 간 질환에서 보호 효과를 나타낼 수 있음을 시사한다. 이후 추가적인 실험을 통해, 실제로 Nrf2를 통한 NEMO의 과발현이 심각한 간 손상 질환이나 경미한 간 손상 질환 모두에서 세포 사멸을 억제함으로써 질환의 치료에 기여할 수 있는지 검증할 필요가 남아있다.

종합적으로, 본 연구의 결과는 (1) NEMO가 Nrf2에 의하여 전사적으로 활성화 된다는 점, (2) 아세트아미노펜 독성 환자에서 NEMO의 발현이 크게 낮다는 점을 새롭게 규명하였다. 따라서 본

연구성과는 처음으로 Nrf2가 TNF α 신호 기전에 관여한다는 것을 증명하였고, 아세타미노펜 독성을 포함한 다양한 간 질환 모델에서 NEMO가 새로운 약물학적 타겟이 될 수 있음을 시사하였다. 특히, Nrf2에 의한 NEMO의 활성화를 통해, Nrf2가 새로운 염증을 동반하는 질환에서도 긍정적인 역할을 할 것으로 생각된다.

V. 참고문헌

1. Bellezza, I., Tucci, A., Galli, F., Grottelli, S., Mierla, A. L., Pilolli, F., & Minelli, A. (2012). Inhibition of NF-kappaB nuclear translocation via HO-1 activation underlies alpha-tocopheryl succinate toxicity. *J Nutr Biochem*, 23(12), 1583-1591. doi:10.1016/j.jnutbio.2011.10.012
2. Black, M. (1984). Acetaminophen hepatotoxicity. *Annu Rev Med*, 35, 577-593. doi:10.1146/annurev.me.35.020184.003045
3. Chen, G., & Goeddel, D. V. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, 296(5573), 1634-1635. doi:10.1126/science.1071924
4. Cory, S., & Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, 2(9), 647-656. doi:10.1038/nrc883
5. Davidson, D. G., & Eastham, W. N. (1966). Acute liver necrosis following overdose of paracetamol. *Br Med J*, 2(5512), 497-499.
6. Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M., & Liu, Z. (2000). The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity*, 12(4), 419-429.
7. Hsu, H., Huang, J., Shu, H. B., Baichwal, V., & Goeddel, D. V. (1996). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity*, 4(4), 387-396.

8. Kaspar, J. W., Niture, S. K., & Jaiswal, A. K. (2009). Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 47(9), 1304-1309. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.035
9. Kondylis, V., Polykratis, A., Ehlken, H., Ochoa-Callejero, L., Straub, B. K., Krishna-Subramanian, S., . . . Pasparakis, M. (2015). NEMO Prevents Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma by Inhibiting RIPK1 Kinase Activity-Mediated Hepatocyte Apoptosis. *Cancer Cell*, 28(5), 582-598. doi:10.1016/j.ccell.2015.10.001
- 10 Krappmann, D., & Scheidereit, C. (2005). A pervasive role of ubiquitin conjugation in activation and termination of IkappaB kinase pathways. *EMBO Rep*, 6(4), 321-326. doi:10.1038/sj.embor.7400380
11. Lee, D. F., Kuo, H. P., Liu, M., Chou, C. K., Xia, W., Du, Y., . . . Hung, M. C. (2009). KEAP1 E3 ligase-mediated downregulation of NF-kappaB signaling by targeting IKKbeta. *Mol Cell*, 36(1), 131-140. doi:10.1016/j.molcel.2009.07.025
12. Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K., & Tschopp, J. (2001). NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol*, 21(16), 5299-5305. doi:10.1128/MCB.21.16.5299-5305.2001
13. Niture, S. K., & Jaiswal, A. K. (2012). Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis. *J Biol Chem*, 287(13), 9873-9886. doi:10.1074/jbc.M111.312694

14. Rothwarf, D. M., Zandi, E., Natoli, G., & Karin, M. (1998). IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature*, 395(6699), 297-300. doi:10.1038/26261
15. Shah, N. M., Zaitseva, L., Bowles, K. M., MacEwan, D. J., & Rushworth, S. A. (2015). NRF2-driven miR-125B1 and miR-29B1 transcriptional regulation controls a novel anti-apoptotic miRNA regulatory network for AML survival. *Cell Death Differ*, 22(4), 654-664. doi:10.1038/cdd.2014.152
16. Stehlik, C., de Martin, R., Binder, B. R., & Lipp, J. (1998). Cytokine induced expression of porcine inhibitor of apoptosis protein (iap) family member is regulated by NF-kappa B. *Biochem Biophys Res Commun*, 243(3), 827-832. doi:10.1006/bbrc.1998.8185
17. Stehlik, C., de Martin, R., Kumabashiri, I., Schmid, J. A., Binder, B. R., & Lipp, J. (1998). Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J Exp Med*, 188(1), 211-216.
18. Vlantis, K., Wullaert, A., Polykratis, A., Kondylis, V., Dannappel, M., Schwarzer, R., . . . Pasparakis, M. (2016). NEMO Prevents RIP Kinase 1-Mediated Epithelial Cell Death and Chronic Intestinal Inflammation by NF-kappaB-Dependent and -Independent Functions. *Immunity*, 44(3), 553-567. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.020
19. Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Kang, M. I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., . . . Talalay, P. (2004). Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of

cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(7), 2040-2045. doi:10.1073/pnas.0307301101

20. Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S. T., Weil, R., Agou, F., . . . Israel, A. (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell*, 93(7), 1231-1240.

Abstract

Transcriptional activation of NEMO and cell survival mediated by Nrf2

Park, Hyun woo

Department of Pharmacology, College of Pharmacy

The Graduate School

Seoul National University

Nrf2 is a central regulator of cell survival and inhibits cell death by scavenging reactive oxygen species(ROS). NF-kB essential modulator (NEMO) also stimulates induction of cellular antiapoptotic proteins by activating NF-kB. Nrf2 and NEMO both are involved in cell survival pathway but how they are related hasn't been studied yet. This study suggested NEMO as a novel target gene of Nrf2 and investigated its functional outcome. Nrf2 activation by sulforaphane led to enhanced IκB degradation and increased RelA level. In Nrf2 KO mice, NEMO level was significantly diminished in

the liver. Consistently, Nrf2 overexpression enhanced NEMO mRNA and protein levels, and this effect was prevented by Nrf2 siRNA knockdown. CHIP sequencing and CHIP assay enabled us to reveal the ability of Nrf2 to transactivate NEMO gene. We also investigated expression level of NEMO in various liver diseases accompanied by cell death. In patients intoxicated with acetaminophen, NEMO was repressed along with decrease of Nrf2. Consistently, Nrf2 and NEMO levels were both lowered in mice treated with a toxic dose of acetaminophen. In contrast, NEMO levels were adaptively increased in the liver of alcoholic patients. Because excessive cell death often causes inflammatory responses, we investigated whether Nrf2 has a role in polarizing macrophage into M1 and M2 subtypes by activating NEMO but it didn't. Our results show that Nrf2 transcriptionally up-regulate NEMO gene, which then inhibits death receptor-mediated pathway, ameliorating toxicant-induced hepatocyte injury.

Key words : Cell death, Nrf2, NEMO, acetaminophen

Student number : 2016-21809